

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-73365

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 35/78

A C B Q 8217-4C

A 2 3 L 1/30

B

A 6 1 K 31/715

C 0 7 G 17/00

Z

審査請求 有 請求項の数6 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-234029

(22) 出願日 平成6年(1994)9月2日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年3月5日、
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌68巻
03号」に発表

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(74) 上記1名の復代理人 弁理士 光来出 良彦 (外
1名)

(71) 出願人 390022954

ホクレン農業協同組合連合会

北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地

(74) 上記1名の代理人 弁理士 光来出 良彦

(72) 発明者 岡 修一

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

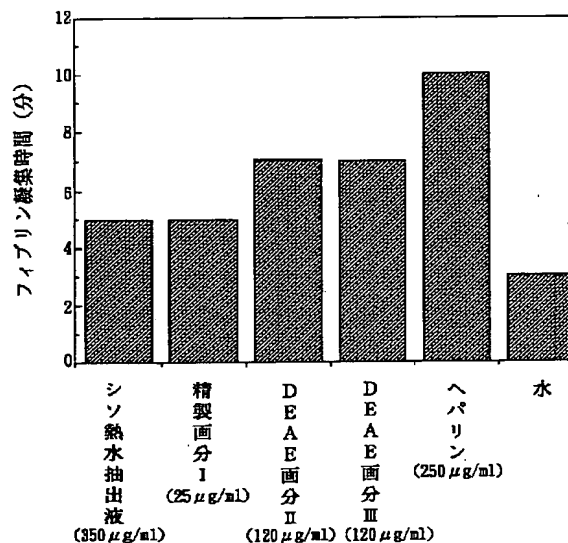
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固阻害物質及びその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 日常摂取している食品中に血液凝固阻害物質
を見だし、安全性の高い血液凝固阻害物質を提供する
ことを目的とする。本発明の血液凝固阻害物質は、血栓
症の治療、予防に有用である。

【構成】 シソを熱水抽出することによって、フィブリ
ン凝集阻害活性を有するシソ熱水抽出物を得る。このシ
ソ熱水抽出物から、さらに精製工程を経てフィブリン凝
集阻害活性を有する分子量が3~10万の多糖類及び/
又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質が得ら
れる。その製造方法は、シソを熱水で抽出し、固液を分
離し、得られる水溶液を沈澱剤により沈澱させ、その水
溶性成分を溶出させ、溶出成分をカラムクロマトグラフ
ィーにより分取して得られる。ICR系マウスを用いた
経口投与によるLD₅₀は2g/Kg以上であった。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フィブリン凝集阻害活性を有するシソ熱水抽出物。

【請求項 2】 シソ熱水抽出物から得られたフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質。

【請求項 3】 請求項 1 記載のシソ熱水抽出物、又は請求項 2 記載の血液凝固阻害物質を有効成分とすることを特徴とする血液凝固阻害剤。

【請求項 4】 シソを熱水にて抽出し、固液を分離し、得られた熱水抽出液からフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質を分離、精製することを特徴とする血液凝固阻害物質の製造方法。

【請求項 5】 シソ熱水抽出物から、固液を分離し、得られる水溶液を沈澱剤により沈澱させ、その水溶性成分を溶出させ、溶出成分をカラムクロマトグラフィーにより分取することを特徴とする、フィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質の製造方法。

【請求項 6】 請求項 1 記載のシソ熱水抽出物、又は請求項 2 若しくは 3 記載の血液凝固阻害物質を食品に添加して血液凝固阻害機能を食品に与えることを特徴とする機能性食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、フィブリン凝集阻害活性を有するシソ熱水抽出物、シソ熱水抽出物から得られるフィブリン凝集阻害活性を有する血液凝固阻害物質及びその製造方法に関し、本発明の血液凝固阻害物質は、血栓症の治療、予防に有用である。

【0002】

【従来の技術】 血管は、その内くを血管内皮細胞で裏打ちされているが、この内皮細胞が障害を受けるとコラーゲンが露出し、この露出したコラーゲンに血小板の粘着、凝集が起り、血液凝固系が活性化される。この過程で、フィブリン網が形成され、形成されたフィブリンには、分子間架橋がかかると共に、フィブロンectinの架橋結合も起り、フィブリンは安定化され、組織に固定され、強固な血栓が形成される。

【0003】 しかしながら、播種性血管内凝固症候群（DIC：disseminated intravascular coagulation）は、様々な基礎疾患を原因として流血中で血液凝固の活性化が起り、微小血管内血栓による臓器症状と消費性凝固障害による出血症状を特徴とする症候群である。その治療においては、基礎疾患の治療に加えて抗凝固療法が有効であり、現在では、例えば、ヘパリン等のフィブリン凝集阻害剤、トロンビン阻害剤である種々の合成抗トロンビン薬、及びプラスミノゲンアクチベーター等の血栓溶解剤が用いられている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、血栓症治療薬は、常用する場合も多くなることから、副作用が少なく安全な治療薬が第一に求められている。従って、本発明は、日常摂取している食品中に血液凝固阻害物質を見だし、提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 前記した問題点を解決するために本発明者らは日常的に食用として用いられている植物中にフィブリン凝集阻害物質を探索した。その結果、シソ科の植物であるシソ中に、血栓症治療薬として有効なフィブリン凝集阻害活性を有する血液凝固阻害物質が含有されていることを見だし、本発明を完成させた。

【0006】 すなわち、本発明のシソ熱水抽出物はフィブリン凝集阻害活性を有することを特徴とする。

【0007】 また、本発明の血液凝固阻害物質は、シソ熱水抽出物から得られたフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる物質であることを特徴とする。本発明の血液凝固阻害物質は、シソ熱水抽出物から、固液を分離し、得られる水溶液を沈澱剤により沈澱させ、その水溶性成分を溶出させ、溶出成分をカラムクロマトグラフィーにより得ることが可能である。

【0008】 また、本発明の血液凝固阻害剤は、シソ熱水抽出物、又はシソ熱水抽出物から得られたフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質を有効成分とすることを特徴とする。

【0009】 また、本発明の血液凝固阻害物質の製造方法は、シソを熱水にて抽出し、得られた抽出液からフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が 3～10 万の多糖類及び／又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質を分離、精製することを特徴とする。

【0010】 本発明の血液凝固阻害物質の原料となるシソは、シソ科の植物及びその近縁植物であり、例えば、青チリメンシソ、赤チリメンシソ、シソ科近縁植物については、カキドオシ、キダンソウ、ウツボグサ、ハッカ、メハジキ、エゴマ、カタメンシソ、ナギナタコウジュ、ヒキオコシ、コガネバナ、セージ、タイム、バジル、ミント、ラベンダー、オレガノ、セボリ、レモンバーム、ローズマリー、キャットニップ、ヒソップ、ベルガモット等を挙げることができる。これらの原料の葉、茎、種子が使用され、生の植物でも乾燥された植物でも利用できるが、乾燥されたものは保存性に富む点において、便利な原料である。

【0011】 本発明において「シソ熱水抽出物」とは、上記原料を熱水中で煮沸することによって得られる水溶性成分をいう。これらのシソから、有効成分を熱水抽出する方法は、適宜の条件下で行うことができるが、一般

的には、例えば、乾燥したシソ葉に水を加え、15分間煮沸処理することによって行われる。

【0012】上記の煮沸処理で得られた熱水抽出液からのさらなる有効成分の分離、精製は、通常の天然物からの精製法に準じて行うことができる。例えば、熱水抽出終了後、濾過、遠心分離等により固、液を分離し、得られる水溶液をセチルピリジニウムクロライドなどの沈澱剤を用いることによって沈澱させ、その沈澱物中より水溶性成分を溶出させ、カラムクロマトグラフィー（例えば、DEAEイオン交換樹脂（東ソー製）を用いたクロマトグラフィー等）等の適宜な手段を用いて得ることができる。本発明の血液凝固阻害物質は、血液凝固阻害物質I、II、IIIが存在する。

【0013】本発明によって得られたシソ熱水抽出物、及び血液凝固阻害物質I、II、IIIは、フィブリン凝集阻害作用を有しており、医薬品、機能性食品用として利用される。本発明のシソ熱水抽出物、及び血液凝固阻害物質I、II、IIIを医薬、機能性食品に利用するには、どのような精製段階のものでも使用することが可能であり、例えば、機能性食品においては、各種精製段階のものを各種食品、例えば、紅茶、清涼飲料水、ジュース、あめ、澱粉質食品、各種加工食品等に添加することによってフィブリン凝集阻害作用が付加された機能性食品を得ることができる。

【0014】また、本発明による血液凝固阻害剤は、これと両立する他の血液凝固阻害剤またはその他の医薬を含んだ形態で用いることができる。

【0015】分子量：血液凝固阻害物質I、II及びIIIの各々を限外濾過膜法（アミコン社製セントリプレッブ）により分子量を測定すると、それぞれ分子量10万のフィルターを通過するが、分子量3万のフィルターは通過しないので、血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、それぞれ3万以上10万以下の分子量であると確認される。

【0016】溶解性：血液凝固阻害物質Iは水及びメタノールに易溶である。

【0017】血液凝固阻害物質II及びIIIは、何れも水にわずかに溶ける。

【0018】血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、何れも中性酢酸エチルで抽出されない。血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、何れも中性n-ブタノールでは抽出されない。

【0019】各種イオン交換クロマトグラフィーにおける吸着特性：血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、何れもDEAE陰イオン交換カラムに吸着する。血液凝固阻害物質IはCM陽イオン交換樹脂に吸着しないことから、酸性物質である。血液凝固阻害物質Iは、1M NaCl溶液で、血液凝固阻害物質IIは50%アセトン溶液で、また血液凝固阻害物質IIIは0.1N HCl含有50%アセトン溶液により、それぞれ順次溶出される。

一方、血液凝固阻害物質I、II及びIIIの何れも、CM-Toyopearl陽イオン交換カラムには吸着しない。

【0020】熱安定性：血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、何れも100℃30分間の熱処理で安定であり、フィブリン凝集阻害活性は失活しない。

【0021】酵素処理安定性：血液凝固阻害物質I、II及びIIIは、何れも30℃、15分間のトリプシン処理で、フィブリン凝集阻害活性は失活しない。

【0022】呈色反応：血液凝固阻害物質Iは、フェノール-硫酸法による呈色反応が陽性であるので、糖であることが示される。

【0023】血液凝固阻害物質Iは、カルバゾール-硫酸法により陽性を示すので、上記各性質を考慮するとウロン酸を含む多糖類であることが分かる。

【0024】血液凝固阻害物質II及びIIIは、ポリクラルA Tで処理すると、沈澱するので、上記各性質を考慮するとポリフェノール類であることが分かる。

【0025】物質の色：血液凝固阻害物質Iは褐色である。

【0026】比旋光度：血液凝固阻害物質Iについて $[\alpha]_D^{25} = -0.4$ (0.25, H₂O)

吸収スペクトル：精製された血液凝固阻害物質Iのチャートを図1に示す。

【0027】赤外線吸収スペクトル：精製された血液凝固阻害物質Iのチャートを図2に示す。

【0028】LD₅₀

精製された血液凝固阻害物質I、II、IIIのLD₅₀はそれぞれ2g/Kg以上である。

【0029】

【実施例】

【実施例1】

シソ葉からの血液凝固阻害物質の製造方法

乾燥したシソ葉100gに水1リットルを加え、15分間煮沸した。次に、この熱水抽出液を冷却後、減圧下で吸引濾過し、固・液を分離した。得られた水溶液500mlに0.5gのセチルピリジニウムクロライドを添加し、30℃12時間放置することによって沈澱が形成した。その沈澱物を、15%エタノール100mlで洗浄し、10,000回転、20分間の遠心分離により試薬を除去した後、沈澱物に50mlの水を添加し、水溶性有効成分を溶出させた。

【0030】得られた水溶液を50mMホウ酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したDEAE-Toyopearlカラム（東ソー株式会社製）に充填し、同緩衝液で洗浄した後、溶出液として1M NaCl溶液、0.1N HCl溶液、50%アセトン溶液、0.1N HCl含有50%アセトン溶液により順次溶出した。回収したそれぞれの画分を減圧乾固し、血液凝固阻害物質I（DEAE画分I）、血液凝固阻害物質II（DEAE画分II）、血液凝固阻害物質III（DEAE画分III）とした。さらに

これらの各物質を精製するために、0.01%の3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオール]-1-ブロパンスルフォネート]水溶液を溶出液とするセルロフィンGC-700ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、精製された血液凝固阻害物質I(精製画分I)、血液凝固阻害物質II(精製画分II)、血液凝固阻害物質III(精製画分III)を得た。

【0031】前記で得られた精製画分I、精製画分II、精製画分IIIを用いて血液凝固試験を行った。その結果を図3に、縦軸にフィブリン凝集時間(クロッティングタイム)、横軸にフラクションナンバーをとったDEAE-Toyoparlカラムクロマトグラムを示す。血液凝固時間は、50分間迄測定を行った。図3によれば、本発明の血液凝固阻害物質I、II、IIIが存在する血液は、50分経過しても血液が凝固しておらず、フィブリン凝集阻害活性があることがわかる。

【0032】〔実施例2〕

フィブリン凝集阻害活性の測定

前記実施例1で得られたシソ熱水抽出液、精製画分I、DEAE画分II及びDEAE画分IIIの各フィブリン凝集阻害活性を、丸山らの方法(Biochem. Biophys. Acta, 1164巻, 215-218頁(1993)に記載)に準じて、以下に示す方法で測定した。

【0033】ウシ由来フィブリノーゲン(シグマ社製)2.5mgを緩衝液(20mM トリス-HCl, pH7.4, 130mM NaCl)1mlに溶解した液0.12mlと、各種被検液0.12mlとを混合し、37度、1分間保温した。その反応液に0.5U/mlになるように20mMトリス塩酸緩衝液(260mM NaCl, 15mM CaCl₂含有, pH7.4)を溶解させた牛トロンビン溶液0.12mlを添加し、37度で反応させ、凝固時間を測定した。その結果を図4のフィブリン凝集時間を縦軸に各種被検液を横軸にしたグラフに示す。

【0034】なお、被検液として、シソ熱水抽出液(350μg/ml)、精製画分I(25μg/ml)、DEAE画分II(120μg/ml)、DEAE画分III(120μg/ml)を用い、対照として水、ヘパリン(250μg/ml)を用いた。

【0035】図4によれば、本発明のシソ熱水抽出液、精製画分I、DEAE画分II、DEAE画分IIIは、フィブリン凝集阻害活性を示すことが分かる。

【0036】〔実施例3〕

LD₅₀

前記実施例1で得られた、精製された血液凝固阻害物質I(精製画分I)、血液凝固阻害物質II(精製画分II)、血液凝固阻害物質III(精製画分III)について、ICR系マウス(雄)を用いて急性毒性試験を行ったところ、これらの物質は2g/kgの経口投与で死亡例はなかった。したがって、精製画分I、II、IIIについて、LD₅₀はそれぞれ2g/kg以上であることが分かる。

【0037】〔実施例4〕市販の紅茶葉を粉碎し、この粉碎物に対して本発明の血液凝固阻害物質Iを3重量%になるように添加してよく混合した。これらの3種類の混合物をティーバックに詰め、血液凝固阻害物質Iが添加されたティーバックを得た。このティーバックを熱湯で溶出することによって、血液凝固阻害物質Iが紅茶に溶出混合し、フィブリン凝集阻害活性が付与された紅茶を得ることができた。

【0038】〔実施例5〕市販のオレンジジュース1kgを3つ用意した。各々のオレンジジュースに対して本発明の血液凝固阻害物質I、II、IIIを3重量%になるようそれぞれ1種を添加してよく混合し、フィブリン凝集阻害活性が付与されたオレンジジュースを得た。

【0039】

【発明の効果】本発明により得られた、シソ熱水抽出液、及びシソ熱水抽出物から得られたフィブリン凝集阻害活性を有する分子量が3~10万の多糖類及び/又はポリフェノール類からなる血液凝固阻害物質は、本明細書記載の優れたフィブリン凝集阻害活性を示す。これらの物質は、摂取許容量が高く、医薬品、もしくは前記物質が添加された機能性食品として有用である。

【図面の簡単な説明】

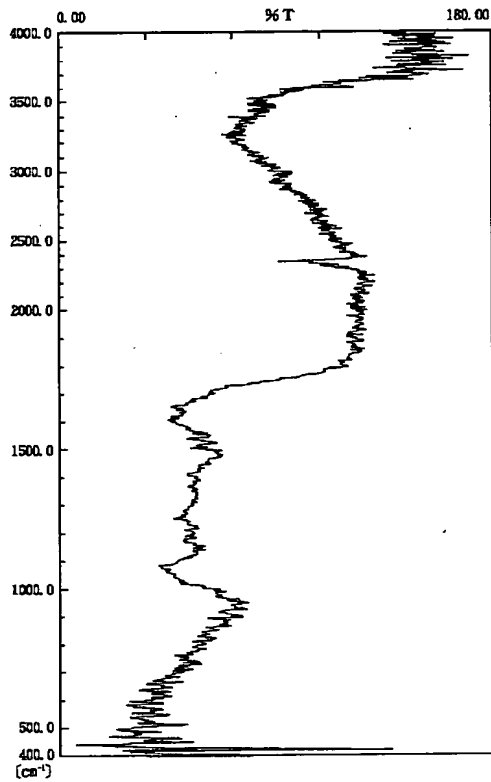
【図1】精製された血液凝固阻害物質Iの吸収スペクトルのチャートを示す。

【図2】精製された血液凝固阻害物質Iの赤外線吸収スペクトルのチャートを示す。

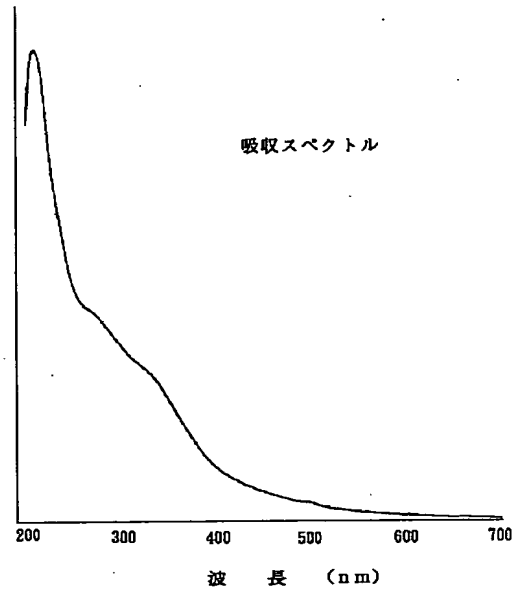
【図3】精製画分I、精製画分II、精製画分IIIについての縦軸にフィブリン凝集時間(クロッティングタイム)、横軸にフラクションナンバーをとったDEAE-Toyoparlカラムクロマトグラムを示す。

【図4】フィブリン凝集時間を縦軸に各種被検液を横軸にしたグラフを示す。

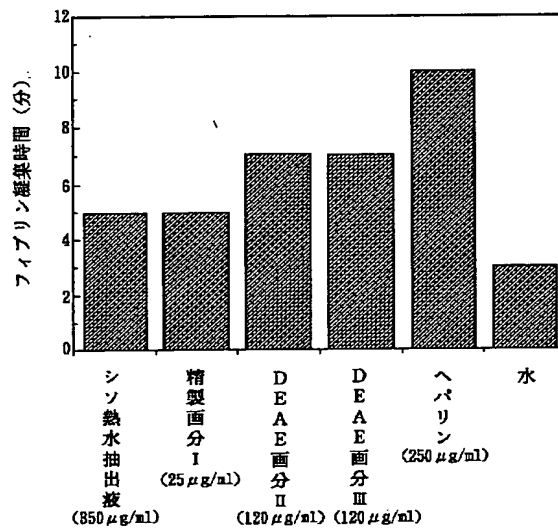
【図1】



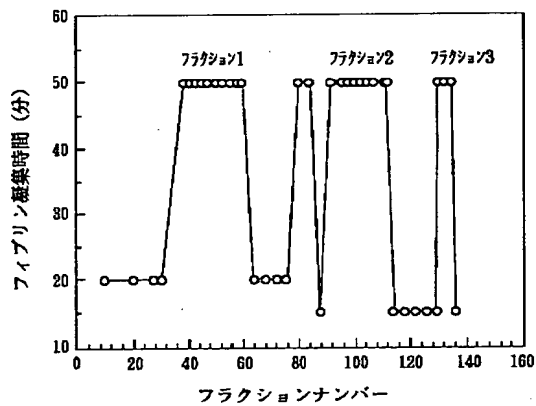
【図2】



【図4】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 井上 真美
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 中込 和哉
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 丸山 進
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内
(72)発明者 岡田 知子
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内
(72)発明者 黒田 映子
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72)発明者 奥野 洋明
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内
(72)発明者 富塚 登
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内
(72)発明者 福森 保則
北海道札幌市中央区北4条西1丁目3番地
ホクレン農業協同組合連合会内